

Nanog 基因在卵巢癌和卵巢肿瘤干细胞中的表达及意义*

赵 乐¹ 纪新强^{1△} 刘 静¹ 武加利² 张文卿³

(1 青岛大学医学院附属医院妇科 山东 青岛 266003 2 山东省济宁市第一人民医院妇产科 山东 济宁 272000 ;

3 青岛大学医学院病原生物学教研室 山东 青岛 266003)

摘要 目的 探讨胚胎干细胞关键因子 Nanog 基因 mRNA 及其蛋白在卵巢癌和卵巢癌肿瘤干细胞中的表达及意义。方法 选取 10 例正常卵巢上皮组织、10 例卵巢良性肿瘤及 60 例卵巢癌组织,采用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和免疫组织化学 PV-6000 两步法检测 Nanog mRNA 和蛋白表达水平;采用无血清悬浮培养法从 SKOV-3 卵巢癌细胞株中分离培养肿瘤干细胞,流式细胞术鉴定肿瘤干细胞 CD117 表达,采用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测 SKOV-3 卵巢癌细胞及肿瘤干细胞中 Nanog mRNA 及其蛋白的表达水平。结果 Nanog mRNA 在卵巢癌组织中的表达水平均高于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤组织($P<0.05$),Nanog mRNA 在不同分化程度及临床分期的卵巢癌组织中表达水平不同,低分化组高于高分化组($P<0.05$),III-IV 期高于 I-II 期($P<0.05$);免疫组化结果同 RT-PCR。从 SKOV-3 卵巢癌细胞株中成功分离出肿瘤干细胞,SKOV-3 卵巢癌细胞和肿瘤干细胞 Nanog mRNA 相对含量分别为 0.6044 ± 0.0368 , 0.8736 ± 0.0537 ,差异具有统计学意义($P<0.05$),两种细胞 Nanog 蛋白相对含量分别为 0.6364 ± 0.0169 , 1.2788 ± 0.0314 ,差别具有统计学意义($P<0.05$)。结论 Nanog 基因在卵巢癌组织和 SKOV-3 细胞系中均高表达,其在组织中的表达强度与临床分期及病理分级关系密切,且在肿瘤干细胞中表达高于一般卵巢癌细胞,其与卵巢癌的发生发展关系密切,可能是卵巢癌干细胞的表面标志物,有望成为新的标志物。

关键词 卵巢癌;Nanog;肿瘤干细胞;基因表达;悬浮培养

中图分类号 R737.31 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)14-2642-05

Expression and Significance of Nanog Gene in Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Stem Cells*

ZHAO Le¹, JI Xin-qiang^{1△}, LIU Jing¹, WU Jia-li², ZHANG Wen-qing³

(1 Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, Shandong Jining First People's Hospital, Jining 27200, China;

3 Department of Microbiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of embryonic stem cells key transcription factor Nanog mRNA and protein in ovarian cancer and cancer stem cells. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were performed to detect the expression of Nanog gene in 10 cases of normal ovaries, 10 cases of benign ovarian tumors and 60 cases of ovarian cancer. Ovarian cancer stem cells were isolated from ovarian cell line SKOV-3 and cultured in serum free medium by nanosphere suspension. Flow cytometry analysis was used to examine the expression of the cell surface marker CD117 in SKOV-3 and ovarian cancer stem cells. We examined the expression of Nanog gene in SKOV-3 and ovarian cancer stem cells by RT-PCR and Western Blot. **Results:** Nanog gene expression in ovarian cancer was significantly higher than in normal ovarian tissue and benign ovarian tumors ($P<0.05$). The Nanog expression was higher in ovarian cancer with poorly differentiated grade or advanced stage than well differentiated or early stage, respectively ($P<0.05$). Ovarian cancer stem cells were isolated, the relative level of Nanog mRNA was 0.6044 ± 0.0368 in SKOV-3 and 0.8736 ± 0.0537 in ovarian tumor stem cell ($P<0.05$). The relative level of Nanog protein was 0.6364 ± 0.0169 in SKOV-3, and 1.2788 ± 0.0314 in ovarian tumor stem cell ($P<0.05$). **Conclusions:** Nanog gene is highly expressed in ovarian cancer and SKOV-3, which is associated with the differentiation and clinic stage. And Nanog gene is more highly expressed in ovarian cancer stem cell than SKOV-3, which is associated with the development and progression of ovarian cancer. Nanog maybe the antigen marker of ovarian cancer stem cells and could be as novel marker for ovarian cancer.

Key words: Ovarian cancer; Nanog; Cancer stem cell; Gene expression; Floating culture system

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)14-2642-05

* 基金项目 山东省自然科学基金(Y2008c33)

作者简介 赵乐(1986-),女,硕士研究生,研究方向 妇科肿瘤,电话 13792476813, E-mail: lele1718@126.com

△通讯作者 纪新强, E-mail: jxqsjy@126.com

(收稿日期 2011-10-26 接受日期 2011-11-22)

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,是妇科肿瘤中病死率是最高的。近年来,随着对肿瘤研究的不断进展,肿瘤干细胞理论的提出为卵巢癌的治疗开辟了新的方向。Nanog 基因是 Chambers 等^[1]和 Mitsui 等^[2]在 2003 年发现的新的多能干细胞标志因子,是维持干细胞自我更新增殖的关键性基因,是全能性或多能性干细胞标志物,目前国内外 Nanog 基因在卵巢癌组织中的研究尚少,我们通过检测卵巢正常组织、良性肿瘤及癌组织中 Nanog mRNA 和蛋白的表达水平;比较其间差异有无统计学意义,并进一步分析其表达水平是否与病理分级、临床分期有关。从 SKOV-3 卵巢癌细胞株中分离培养肿瘤干细胞,比较其与一般卵巢癌细胞 Nanog mRNA 和蛋白表达水平差异,从而初步探讨 Nanog 基因在卵巢癌发生发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

所有标本均取自青岛大学医学院附属医院妇科 2009 年 10 月至 2010 年 4 月间卵巢手术患者,年龄 35-72 岁,术前均未行放疗、化疗或激素等抗肿瘤治疗,术后经病理检查确诊,有详细的临床、病理资料。正常卵巢组织 10 例,良性卵巢肿瘤 10 例,原发性卵巢癌患者 60 例,根据 FIGO 2000 手术病理分期标准 I 期-II 期 35 例,III 期-IV 期 25 例。根据 WHO 组织分级标准,高分化 12 例,中分化 24 例,低分化 24 例。

1.2 细胞株、主要试剂及仪器

细胞株为人卵巢癌细胞株 SKOV-3,购自中科院上海细胞库。DMEM/F12 培养基(1:1, Hyclone), β 27(Invitrogen);人表皮生长因子(EGF)和人碱性成纤维生长因子(bFGF)(Peprotech);0.25 %胰蛋白酶+0.04 %EDTA 消化液和优级胎牛血清(天津灏阳 TBD);CD117-PE 抗体(eBioscience);Nanog 引物和 UNI-Q-10 柱式 RNA 抽提试剂盒(上海生工);Dnase i(Fermentas);Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas);PCR master mix(Fermentas);兔抗人 Nanog 多克隆抗体(博奥森),通用型二抗(PV-6000)(北京中杉)。

1.3 免疫组织化学

PV-6000 方法检测卵巢癌组织 Nanog 蛋白表达,常规石蜡包埋切片,脱蜡,使用 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(PH=6.0)高温高压修复抗原,加入一抗兔抗人 Nanog(1:200 稀释)后 37 °C 孵育 1 h,加二抗后 37 °C 孵育 20 min,其余具体按常规 PV-6000 方法操作。选取精原细胞瘤作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定:光镜下 Nanog 抗原阳性反应为位于细胞浆内出现棕黄色颗粒。先按阳性细胞率进行评分, $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $\geq 76\%$ 为 4 分;再按染色强度评分,不着色为 0,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者相乘,程度分为 4 个等级:阴性(-)(0、1、2);弱阳性(+)(3、4);中度阳性(++)(6、8);强阳性(+++)(9、12)。

1.4 RT-PCR 检测卵巢癌组织中 Nanog mRNA 表达

采用 RNA 抽提试剂盒(离心柱型)提取卵巢组织总 RNA,紫外分光光度计检验纯度并定量,所得 RNA 的吸光度值(A260/A280)均在 1.8-2.0 范围内。取 1 μ g 的 RNA,经 Dnase 处理除去可能混有的基因组 DNA 后,按照 RevertAid First

Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作,反转录成 cDNA,进行 PCR 反应:PCR Master Mix 12.5 μ L+上下游引物(10 μ mol/ μ L)各 1 μ L+cDNA 模板 3 μ L+depc 水 7.5 μ L,总反应体系为 25 μ L。Nanog 引物上游 5'-ATGCCTGTGATTTGTGGGCC-3',下游 5'-GCCAGTTGTTTTCTGCCAC-3' 为 403 bp,hGAPDH 引物上游 5'-GGCTCTCCAGAACATCAT-3',下游 5'-CACCTGTGCTCAGTGTA-3',为 240 bp。反应条件为:94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min 共 35 cycle,72 °C 延长 10 min。以 hGAPDH 为内参,取扩增产物进行 1.5 %琼脂糖凝胶电泳后,利用 UVP 凝胶图像分析系统摄像,用 Quantity One 进行灰度值分析,以目的产物与内参照的灰度值比值表示目的基因 Nanog mRNA 的相对含量。每个样本均重复 3 次。

1.5 细胞培养及肿瘤干细胞分离培养

参照本实验室已建立的无血清培养法^[3],待培养在含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 的 SKOV-3 肿瘤细胞生长至对数生长期后,用 0.25 %胰蛋白酶+0.04 %EDTA 消化液,37 °C 消化 3-5 min 后,用含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化,并吹打成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,去上清,DMEM/F12 洗涤一次后,重悬于无血清培养液(DMEM/F12,内含 2 %B27、20 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF、4 μ g/ml 肝素钠、6 mg/ml 葡萄糖、2 μ g/ml 胰岛素、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)中继续培养。每隔 2 天添加 2 ml 无血清培养液,每 7 天传代 1 次。

1.6 肿瘤干细胞的鉴定

收集 7 代肿瘤细胞球和 SKOV-3 肿瘤细胞,经胰蛋白酶消化成单细胞后,PBS 洗涤细胞 2 次,调整细胞为 100 μ L(1×10^6 个/ml),加入 CD117-PE 抗体 5 μ L 标志细胞,同时荧光抗体设对照,避光操作,室温孵育 15 min,1000 r/min 离心 5 min,去上清,加入 300 μ L PBS,吹打均匀后流式细胞仪检测 CD117 荧光强度。

1.7 RT-PCR 检测

SKOV-3 贴壁细胞和肿瘤干细胞球的 Nanog mRNA 表达,收集 SKOV-3 肿瘤细胞和 7 代 SKOV-3 肿瘤干细胞球两种细胞,其他实验步骤同方法 1.4。

1.8 Western blot

收集 SKOV-3 肿瘤细胞和 7 代 SKOV-3 肿瘤干细胞球两种细胞,加入蛋白裂解液 WIP 和 PMSF,按照蛋白裂解液说明书操作提取蛋白,行 BCA 法测蛋白浓度,取 30 μ g 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳后,转移至 PVDF 膜后,5 %脱脂奶粉 4 度摇床封闭过夜,分别加入兔抗人 Nanog 多克隆抗体(1:250 稀释)和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(1:1000 稀释),摇床室温孵育 2 小时,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min 后,分别加入按 1:1000 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗室温孵育 2 小时,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min。ECL 发光系统检测 Nanog 蛋白的表达情况。拍照后应用 Quantity One 进行灰度值分析,比较两者 Nanog 蛋白表达差异。

1.9 统计学方法

定量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 统计软件分析,定量资料采用 t 检验及单因素方差分析,定性资料采用 χ^2 检验及符号秩和 H 检验分别进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Nanog 蛋白在卵巢组织中的表达

Nanog 蛋白在卵巢癌组织中强表达,阳性反应呈棕黄色颗粒,主要位于细胞质(图 1B),卵巢正常组织和良性肿瘤中 Nanog 蛋白不表达或少量表达(图 1A),Nanog 蛋白在不同卵巢组织中的表达情况见表 1。结果表明 Nanog 蛋白在卵巢正常组织、良性肿瘤、恶性肿瘤之间表达水平不同,差异有统计学意义($H_c=24.2875, P<0.05$),进一步两两比较示正常组织与良性肿瘤之间无统计学差异($P>0.05$),但恶性肿瘤与正常组织或良性肿瘤相比,Nanog 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。另外卵巢癌分化程度不同,Nanog 蛋白表达也不同($H_c=27.1012, P<0.05$),两两比较均有统计学差异;在不同卵巢癌临床分期中,晚期卵巢癌组织(III 期-IV 期)Nanog 蛋白表达与早期卵巢癌(I 期-II 期)相比,差异有统计学差异($H_c=27.3656, P<0.05$)。

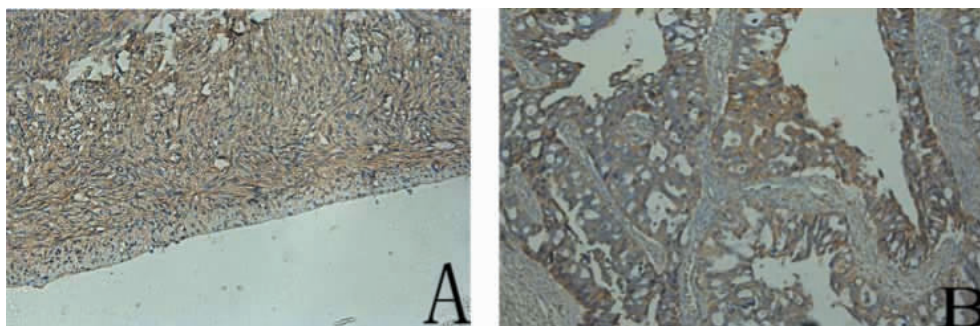


图 1 Nanog 蛋白在卵巢组织中的表达($\times 200$) A:正常卵巢组织 B:卵巢癌组织

Fig.1 The expression of Nanog protein in ovarian tissues($\times 200$) A:Normal ovaries B:ovarian cancer

表 1 Nanog 蛋白在各种卵巢组织的表达

Table 1 The expression of Nanog protein in ovarian tissues

	n	-	+	++	+++	Immunopositive(%)
Normal ovarian tissues	10	8	2	0	0	20.0
Benign ovarian tumors	10	7	3	0	0	30.0
Ovarian cancer	60	8	10	28	14	86.7
Pathology grade						
G1	12	6	4	2	0	50.0
G2	24	2	6	12	4	91.7
G3	24	0	0	14	10	100
Clinical staging						
I-II	35	8	8	19	0	77.1
III-IV	25	0	2	9	14	100

2.2 Nanog mRNA 在卵巢组织中的表达

如图 2 所示,hGAPDH 和 Nanog 的预期扩增片段大小分别为 240 bp、403 bp。卵巢正常组织、良性肿瘤、恶性肿瘤中 Nanog mRNA 检出率分别为 30%(3/10)、30%(3/10)、90%(54/60)。在卵巢正常组织、良性肿瘤及恶性肿瘤中的 Nanog mRNA 相对含量见表 2,Nanog mRNA 在卵巢癌组织中的表达高于卵巢正常组织及良性肿瘤($P<0.05$),但正常组织和良性肿瘤之间无明显差异($P>0.05$)。进一步分析显示 Nanog mRNA 在不同分化程度卵巢癌中表达水平不同,差异有统计学意义($F=30.80, P<0.01$),且晚期卵巢癌组织的 Nanog mRNA 表达量明显高于早期卵巢癌组织中的表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。

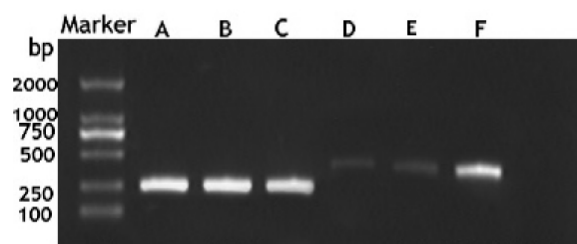


图 2 RT-PCR 检测 Nanog mRNA 在卵巢组织中的表达

A-C 依次为卵巢正常组织、卵巢良性肿瘤及卵巢癌组织的内参照 hGAPDH D-F 为相对应的目的基因 Nanog

Fig.2 RT-PCR detects the expression of Nanog mRNA in ovarian tissues

A:Normal ovaries' hGAPDH B:Benign ovarian tumors' hGAPDH C:Ovarian cancers' hGAPDH D-F Nanog of A-C

表 2 Nanog mRNA 在各种卵巢组织中的表达
Table 2 The expression of Nanog mRNA in ovarian tissues

	n	The expression of Nanog mRNA($\bar{x} \pm s$)
Normal ovarian tissues	10	0.0148 $\pm$ 0.0332
Benign ovarian tumors	10	0.0189 $\pm$ 0.0349
Ovarian cancer	60	0.4342 $\pm$ 0.1619
Pathology grade		
G1	12	0.1906 $\pm$ 0.0821
G2	24	0.4360 $\pm$ 0.0845
G3	24	0.5542 $\pm$ 0.1042
FIGO staging		
I-II	35	0.3127 $\pm$ 0.1259
III-IV	25	0.6174 $\pm$ 0.0725

2.3 肿瘤细胞球的形成及培养

SKOV-3 可在无血清培养液中成悬浮生长,肿瘤细胞球可经过 0.25 %胰蛋白酶 +0.04 %EDTA 消化传代,并可持续传代,目前已传代至 20 代,未见明显变化。冻存后复苏,仍可保持其生长活性。

2.4 肿瘤干细胞鉴定

流式细胞检测显示肿瘤细胞球中高表达 CD117,荧光强度分别为 (5.61 $\pm$ 0.05),SKOV-3 肿瘤细胞的荧光强度分别为 (3.18 $\pm$ 0.02)。肿瘤细胞球明显高于正常贴壁细胞,约为贴壁细胞的 1.76 倍,差异有统计学意义($P<0.05$),无血清培养可获取肿瘤干细胞球。

2.5 RT-PCR 检测 Nanog mRNA 在卵巢癌 SKOV-3 细胞和肿瘤干细胞球中的表达

如图 3 所示,hGAPDH 和 Nanog 的预期扩增片段的大小分别为 240 bp、403 bp。SKOV-3 卵巢癌细胞和肿瘤干细胞均在 Nanog 基因相应片段大小的位置上出现条带,二者 Nanog mRNA 的相对含量分别为 0.6044 $\pm$ 0.0368 和 0.8736 $\pm$ 0.0537,肿瘤干细胞球约为贴壁细胞的 1.45 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。

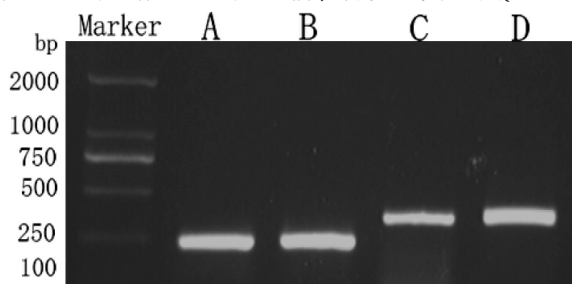


图 3 RT-PCR 检测 Nanog mRNA 在卵巢癌 SKOV-3 和肿瘤干细胞球中的表达

A:SKOV-3 hGAPDH B:肿瘤干细胞球 hGAPDH C:SKOV-3 Nanog D:肿瘤干细胞球 Nanog

Fig.3 RT-PCR detects the expression of Nanog mRNA in SKOV-3 and cancer stem cells

A: SKOV-3 hGAPDH B:Cancer stem cells hGAPDH

C: SKOV-3 Nanog D: Cancer stem cells Nanog

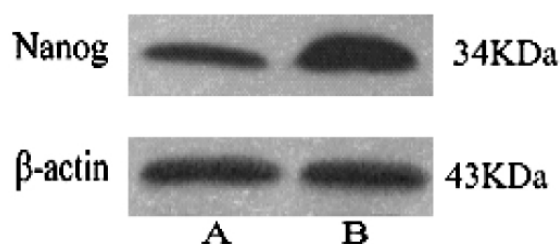


图 4 WesternBlot 检测 Nanog 蛋白在 SKOV-3 和肿瘤干细胞球中的表达

A :SKOV-3 肿瘤细胞 B :SKOV-3 肿瘤干细胞球

Fig.4 Western Blot detects the expression of Nanog protein in SKOV-3 and cancer stem cells

A:SKOV-3 B:SKOV-3 cancer stem cells

2.6 Western Blot 检测 Nanog 蛋白在 SKOV-3 和肿瘤干细胞球中的表达

如图 4 所示,SKOV-3 贴壁细胞和肿瘤干细胞中的 Nanog 蛋白相对含量分别为 0.6364 $\pm$ 0.0169,1.2788 $\pm$ 0.0314,约为贴壁细胞的 1.6 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

卵巢原发性恶性肿瘤中,60%-90%是卵巢上皮性癌,发展迅速,不易早期诊断,在治疗方面,虽然通过手术、化疗或放疗,可以取得一定的疗效,但仍然不满意,卵巢上皮性癌发病率高而存活率最低,但其发病机制尚未阐明,因此,对卵巢肿瘤的起源等相关问题的研究,将会有最大的意义。近年来随着肿瘤干细胞理论的不断研究,其理论渐趋成熟,认为肿瘤是一种干细胞疾病^[3],肿瘤组织中的肿瘤细胞是由少数肿瘤干细胞和绝大多数表型不同的肿瘤分化细胞组成,肿瘤的生长、转移、复发的根源是靠这些少数的肿瘤干细胞不断自我更新以及繁衍来维持和促成的^[4]。因此肿瘤干细胞的相关研究是卵巢癌研究中亟需解决的重大课题。

Nanog 基因是 Chambers 和 Mitsui 等^[1-2]2003 年在胚胎干细胞内发现新的转录因子,它属于 ANTP 类 NK 家族基因,位于人体第 12 号染色体,12p13.31,全长 6661bp,由 4 个外显子

和 3 个内含子组成,编码 305 个氨基酸,是维持干细胞自我增殖和多向分化的关键性基因。Nanog 除了在胚胎发育早期和胚胎干细胞表达外,有研究表明 Nanog 基因在睾丸原位癌、胚胎性癌和精原细胞瘤等^[9]生殖细胞肿瘤中特异性表达,随后研究表明 Nanog 基因在乳腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌等^[10]实体肿瘤中也可以表达,肿瘤级别越高,Nanog 基因的表达越强,临床预后越差,并且高级别肿瘤具有胚胎干细胞的特性。这与我们的研究结果相符。因此探讨 Nanog 在卵巢癌组织、普通的卵巢癌细胞及卵巢癌干细胞中的表达与卵巢癌的发生、发展有重要的意义。

目前研究^[9]发现 Nanog 基因具有 11 个假基因,与 Nanog 基因的 mRNA 序列同源性很高,假基因是不转录的。本研究设计的 Nanog 基因及 hGAPDH 引物均跨越内含子,但实验过程中发现组织提取 RNA 如不经过 DNA 酶处理,PCR 扩增结果均为阳性表达,原因在于假基因的存在。因此实验中我们同时应用 DNA 酶处理,可以保证反转录不受基因组 DNA 的干扰,即不受假基因的干扰,保证结果的准确性。

本研究结果显示 Nanog mRNA 和蛋白的表达在卵巢癌的阳性表达率明显高于正常卵巢组织和良性卵巢肿瘤,并且其表达强度随着临床分期和病理分级的增高而升高,分期越晚、级别越高表达水平越强,表明 Nanog 基因与卵巢癌的发生有关,且在一定程度上影响着分化程度。同时 Nanog 基因在卵巢癌组织中的返祖性表达,表明其可能是与分化相关的重要调节因子,可能引起正常细胞向相反方向演变,使肿瘤细胞维持低分化或者未分化状态,为卵巢癌组织中肿瘤干细胞的存在提供理论依据。

先期实验^[9]已通过无血清培养法从卵巢癌细胞系 SKOV-3 中成功分离出悬浮生长的肿瘤细胞球,并且高表达 CD117 的肿瘤干细胞球较贴壁的 SKOV-3 肿瘤细胞具有强侵袭力、耐药性等多种肿瘤干细胞的特性,因此本研究采用流式细胞仪检测悬浮细胞球中 CD117 表达情况对肿瘤干细胞进行鉴定,对鉴定后的细胞球和肿瘤细胞进行 Nanog 基因的检测,结果显示 Nanog mRNA 和蛋白在卵巢癌细胞系 SKOV-3 和高表达 CD117 的卵巢癌干细胞中均表达,且在悬浮细胞干细胞球中的表达水平明显高于贴壁生长的 SKOV-3 细胞。表明卵巢癌干

细胞中高表达 Nanog 基因,且具有强侵袭力及耐药性。因此 Nanog 可能是卵巢癌干细胞的表面标志物,但尚不能说 Nanog 阳性细胞一定为肿瘤干细胞,尚需要进一步研究。

综上所述,Nanog 基因在卵巢癌组织和 SKOV-3 中均高表达,且通过无血清悬浮培养富集的肿瘤干细胞表达水平显著高于 SKOV-3 肿瘤细胞,表明 Nanog 基因在卵巢癌的发生和进展中起到重要的作用,有望成为判定卵巢上皮性癌恶性程度的参考指标,为研究卵巢癌的起源及生物学行为提供新途径。但是 Nanog 基因如何决定肿瘤细胞的干细胞特性,其在卵巢癌组织中的作用机制、分子信号传导通路等问题均未解决,尚需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. Cell, 2003, 113(5):643-655
- [2] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and cells [J]. Cell, 2003, 113(5):631-642
- [3] Huntly BJ, Gilliland DG. Cancer biology: summing up cancer stem cells [J]. Nature, 2005, 435(7046):1169-1170
- [4] AL-HAJJ M, CLARKE MF. Self-renewal and solid tumor stem cells [J]. Oncogene, 2004, 23(43):7274-7282
- [5] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development [J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5(5):639-646
- [6] Hart AH, Hartley L, Parker K, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors [J]. Cancer, 2005, 104(10):2092-2098
- [7] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem Cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors [J]. Nat Genet, 2008, 40(5):499-507
- [8] Booth HA & Holland PW. Eleven daughters of NANOG [M]. Genomics, 2004, 84(2):229-238
- [9] 武加利, 纪新强, 刘佳, 等. 人卵巢癌干细胞的分离培养和初步鉴定 [J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(12):893-896
Wu Jia-li, Ji Xin-qiang, Liu Jia, et al. Isolation and initial identification of human ovarian cancer stem cells [J]. Prog Obstet Gynecol, 2010, 19(12):893-896
- [10] 2010, 19(3):253-246
- [11] 栾天竹, 梅宇, 许冬秀, 等. 三氧化二砷对球囊拉伤后兔血管平滑肌细胞作用的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(10): 859-861
Luan Tian-zhu, Mei Yu, Xu Dong-xiu, et al. Effect of arsenic trioxide on rabbit vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty [J]. National Medical Journal of China, 2003, 83(10): 859-861
- [12] 栾天竹, 季洪亮, 傅松滨, 等. 三氧化二砷对人冠状动脉平滑肌细胞及基质作用的实验研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19(3): 253-246
Luan Tian-zhu, Ji Hong-liang, Fu Song-bin, et al. Effects of arsenic trioxide on E2F-1 and EMAP- of smooth muscle cells of human coronary artery in vitro [J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2010, 19(3):253-246
- [13] 栾天竹, 傅松滨, 周立君, 等. 三氧化二砷对人冠状动脉平滑肌细胞作用的体外观察 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(2): 133-137
Luan Tian-zhu, Fu Song-bin, Zhou Li-jun, et al. Effects of arsenic trioxide on human coronary smooth muscle cells: experiment in vitro [J]. National Medical Journal of China, 2009, 89(2):133-137
- [14] Komatsu R, Ueda M, Naruko T, et al. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses [J]. Circulation, 1998, 98(3): 224-233
- [15] Nakae H, Endo S, Yamada Y, et al. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns [J]. Burns, 2000, 26(2): 139-144